台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):137–156 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.04

分子標幟輔助耐鹽水稻之選育

郭素真[1] 郭介煒[2] 林彥蓉[3] 吳永培[4,*]

摘要

郭素真、郭介煒、林彥蓉、吳永培。分子標幟輔助耐鹽水稻之選育。台灣農業研究 62(2):137–156。

本研究以稉型稻耐鹽品系 SM61 為貢獻親，而世界栽培面積廣泛的優良秈稻品種 IR64 為輪迴親，透過回交方式將 SM61 之耐鹽性轉移至 IR64，過程中利用 200 mM 氯化鈉 (NaCl) 溶液的鹽分逆境處理挑選出耐鹽的植株，並於各回交世代 F_1 進行分子標幟輔助背景選拔，結果發現各 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_3F_1 世代回復輪迴親比率分別為 75.0、89.0、96.4%，高於傳統回交方式之 BC_3F_1 世代回復至輪迴親之 93.8% 的結果，顯示利用分子標幟輔助可較快速回復輪迴親 IR64 之遺傳背景，提高耐鹽水稻新品種之選育效率。而以 SM61、IR64 及 6 個 BC_3F_4 品系於三葉齡、五葉齡、七葉齡及最高分蘗期等 4 個時期，分別以 200 mM NaCl 的鹽分逆境處理評估材料之耐鹽性表現，試驗發現 ST12、ST18 及 ST59 等 3 個品系之耐鹽性表現優於貢獻親 SM61 及輪迴親 IR64，顯示已將 SM61 之耐鹽特性導入 IR64 中，培育出高耐鹽之秈型稻新品系。而進一步評估 20 個耐鹽品系 (BC_3F_4) 產量表現，結果發現各品系產量均可達 5,000 kg ha^{-1} 以上，顯示獲選之耐鹽品系皆已具有實際栽培價值，未來於命名成為新品種後，其將可供鹽分地水稻之栽培利用，進而增加未來國內外稻米糧食之生產。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、突變品系、耐鹽水稻。

前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 係世界排名前三名之重要糧食作物，隨著全球人口數量持續增加，預計在 2030 年時將達到 80 億，水稻生產則必須增加 50% 方可滿足人類對糧食的需求 (Khush & Brar 2002; Khush 2005)。然而，人口的增長可能使得一些耕作土地轉變為工業及居住用地，迫使水稻之耕作轉移至生產力較低的鹽分地，使得糧食短缺現象雪上加霜。此一窘境，促使研究學者積極投入水稻耐鹽性之相關研究。

在邁入後基因體時代後，水稻育種學家試著將分子生物技術融入於傳統育種工作上，藉以縮短水稻新品種育成的年限。國際水稻基因體計畫 (International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 於 1997 年開始針對稉稻 ‘日本晴’ (‘Nipponbare’) 進行水稻基因體序列的研究，並於 2005 年完成全基因體共約 389 Mb 的解序 (International Rice Genome Sequencing Project 2005)。此一結果促進了各種分子標幟的發展，隨後更將其應用於水稻育種上，藉以提高育種效率和準確性 (Collard & Mackill 2008)，此即現行所稱的分子標幟輔助選拔 (marker-assisted selection; MAS)。此一作法除了能夠縮短傳統育種所需的年限外，還具備目標植株挑選不受到環境干擾的效果，目標基因性狀更可於植株幼苗期進行選拔，獲得減少田間種植數量、人力和物力花費等的優點。尤有甚者，其能夠於單一植株上同

投稿日期：2013 年 1 月 30 日；接受日期：2013 年 4 月 12 日。
[*] 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所農藝系研究助理。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。
[3] 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

時進行多個性狀的選拔，或將多個優良性狀基因堆砌於同一優良水稻品系中。

目前水稻育種上利用分子標幟輔助育種技術的成果相當多，如：國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 將稉稻 Azucena 上所發現的 4 個與耐旱相關的數量性狀基因座 (quantitative trait locus; QTL)，利用分子標幟輔助回交育種方法將 QTLs 片段轉移至優良栽培種 ‘IR64’，有效提高 ‘IR64’ 的耐旱性 (Courtois & Lafitte 2003)。又利用分子標幟輔助回交育種方法，將耐淹浸 *Sub1* QTL，導入 ‘Swarna’、‘IR64’ 和 ‘Sumba Mahsuri’ 等水稻品種，除了保有品種原有的高產和優良農藝性狀外，更增加了耐淹之特性，培育出超越原親本之優良品種 (‘mega’ varieties; Neeraja *et al.* 2007)。此外，其他尚有抗稻熱病 (Hittalmani *et al.* 2000)、抗褐飛蝨 (Sharma *et al.* 2004; Myint *et al.* 2012)、產量、半矮性 (Ashikari *et al.* 2005) 及大量應用 MAS 在改良水稻育種上的多個實例 (Collard *et al.* 2008) 等，有效提高了水稻的米質、抗病及抗逆境的特性。至於在耐鹽水稻品種育成上，目前印度已經藉由地方栽培種，成功培育出 ‘Damodar’、‘Pokkali’、‘Nona Bokra’ 和 ‘Bhura Ratha’ 等耐鹽的水稻品種，但是大部分的品種產量均表現不佳 (Singh & Mishra 2004)，這些稻種皆仍利用傳統育種方式選育，藉由分子標幟輔助選育的模式則尚處於測試階段。國際稻米研究所曾利用 ‘Pokkali’ 和 ‘IR29’ 雜交之 F_8 重組自交系族群所進行的耐鹽研究中，發現一個高耐鹽品系 ‘FL478’ (‘IR66946-3R-178-1-1’)，目前已利用分子標幟輔助回交育種方式，將 FL478 *saltol* QTLs 轉入一些優良品種中，以期培育出高耐鹽且高產的新品系 (Thomson *et al.* 2010)；其次，亦根據圖譜定位找到 3 個與幼苗存活日數相關之 QTLs，其幼苗存活日數會因耐鹽 QTLs 的堆疊數目增加而提高植株的耐鹽性 (Cheng *et al.* 2012)。

物理和化學誘變可加速作物變異，係品種改良上值得嘗試的途徑，而目前利用誘變開發耐鹽水稻之研究成果並不多，Jwo (2007) 以疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變水稻 ‘台農 67 號’ 之突變系，結果分別選育出耐鹽性及感鹽性突變品系。Yen (2011) 由甲基磺酸乙酯 (EMS) 誘變系中亦篩選出 11 個耐鹽品系，其中以 ‘SM75’ 與 ‘SM61’ 兩品系耐鹽性之表現甚至較 ‘Pokkali’ 和 ‘Nona Bokra’ 優良，並發現高耐鹽 ‘SM61’ 品系之耐鹽性是由單一顯性基因所控制，且耐鹽基因與第八對染色體上的分子標幟 RM223 有連鎖關係存在。而 Hsu (2010) 和 Chiou (2011) 從蛋白質體的角度發現有 24 個蛋白質點在 3 種不同耐鹽程度的水稻植株會有不同差異表現，顯示利用化學誘變方法確實可以造成栽培稻在耐逆境下之蛋白質表現發生改變。

本試驗使用經化學誘變所得之耐鹽品系為材料，透過分子標幟輔助回交育種的方式，將耐鹽特性轉移至秈型稻 ‘IR64’ 中，期建立分子標幟輔助耐鹽水稻育種之模式。並藉此選育耐鹽秈稻新品種，提供非基因轉殖耐鹽品系在育種及分生上之利用，以因應未來氣候變遷下耐鹽逆境之水稻育種、栽培及糧食生產時所需之優良種原。

材料和方法

試驗材料

回交族群之建立：試驗材料為水稻 ‘台農 67 號’ (*Oryza sativa* L. ‘TNG 67’) 種子經疊氮化鈉誘變，所獲得之 ‘嘉農育 911303 號’ (‘CNY911303’) 品質優良突變系。此品系再以 100 mM EMS 誘變後，於 M_5 世代經由耐鹽性篩選得到耐鹽品系 ‘SM61’，其後再以譜系法純化繁殖得到穩定之耐鹽突變系 (M_{17})。本品系經進行台灣水稻品種權申請之品種性狀表所列 70 個農藝性狀調查，結果發現與 ‘台農 67號’ 並無差異存在，唯田間觀察本品系較 ‘台農 67 號’ 株高約矮 5–7 cm，穗長度亦稍短，生育初期生長速度較為緩慢。在水耕方式培育時，更發現其根系發育約為 ‘台農 67 號’ 之一半；經以 100、150、200、250、300 mM 等

04-吳永培.indd 138 2013/7/8 下午 04:09:12

不同濃度 NaCl 溶液於五葉齡秧苗期重複進行鹽分逆境處理，'SM61' 對逆境之耐受能力接近或優於耐鹽品種 'Pokkali' 及 'Nona Bokra' (均為 3–5 級)。由於 'SM61' 之耐鹽性優良，故乃以其為母本、'IR64' 為父本雜交後得到 F_1 種子，再重複與輪迴親本 'IR64' 進行回交，從而建立分子標幟輔助選拔所需 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_3F_1 之各世代材料 (圖 1)。在各回交世代中，其 BC_1F_1 植株有 160 株、BC_2F_1 為 144 株、而 BC_3F_1 世代則有 300 株，各回交世代之植株經 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理後之存活植株，乃進一步供分子標幟輔助背景選拔，而獲選之植株則移植至田間種植，於抽穗時期供為母本，以進行回交操作。其中，BC_1F_1 及 BC_2F_1 經分子標幟背景選拔之獲選植株 6 株，即由各回交單株其分子標幟基因型分析結果，挑選出與輪迴親 'IR64' 最相似度最高 6 株，供作為母本進行回交。至於 BC_3F_1 獲選之耐鹽植株則於移植田間培育後，經自交所得之 BC_3F_2 後再進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，其存活植同樣移植於田間供產量試驗，其後再依譜系法繼續純化繁殖成 BC_3F_3 及 BC_3F_4 品系，以供初級、高級產量試驗及不同水稻發育時期耐鹽性之調查利用。

至於對照組傳統回交法之操作 (TBC_1F_1、TBC_2F_1、TBC_3F_1) 與分子標幟輔助選拔者相似 (圖 1)，每一回交世代均取 100 個植株進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，存活植株再逢機選出 6 株做為母本回交至 'IR64'。過程中不進行分子標幟輔助背景選拔，僅於 TBC_3F_1 世代利用 100 個分子標幟進行基因型分析，藉以了解其與 'IR64' 間之遺傳相似度。

耐鹽品系產量試驗：(1) 初級產量試驗：分子標幟輔助獲選之 BC_3F_1 世代其經耐鹽處理後存活的植株，經自交後單株收穫之種子繁殖為 BC_3F_2 品系，其 BC_3F_2 品系先進行 200 mM NaCl 溶液耐鹽性評估後，選擇耐鹽性較佳而存活的 BC_3F_2 植株繼續繁衍成 BC_3F_3 品系。而根據各 BC_3F_2 耐鹽等級表現為基礎，分別挑選出 ST1 至 ST20 等 20 個耐鹽之 BC_3F_3 品系供初級產量試驗利用。初級產量試驗於 2011 年二期作進行，每品系種植 100 株，每一品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，不設重複，於成熟時各品系分別收穫調查稻穀產量表現。(2) 高級產量試驗：初級產量試驗各品系分別收穫 4 株材料 (BC_3F_4) 於 2012 年一期及二期作供進行高級產量試驗。其中，在二期作試驗時剔除 'ST20' 品系，改以 'IR64' 作為參試之材料。試驗採用 RCBD (randomized complete block design) 設計，每一品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，4 重複，於成熟時收穫並調查各品系之小區稻穀產量。

本試驗所有材料之培育及種植，皆於行政院農業委員會農業試驗所之嘉義分所水稻試驗田區進行，其田間管理按一般慣行法栽培。

耐鹽性表現調查

水稻耐鹽性等級之調查：水稻種子以培養皿殺菌及浸種發芽後，點播於 50 cm × 60 cm 之 80 孔的栽培盤以水耕方式栽培，以 'IR64' 為鹽分敏感型對照品種。秧苗培養液採用改良式木村氏 B 培養液配方 (Kimura B solution) (Yoshida *et al.* 1976)，待全盤幼苗生長至 5–6 葉齡後，乃以含 200 mM NaCl 之水耕液進行鹽分逆境處理，待 'IR64' 鹽害等級達 7 級，即回復至一般水耕液培養，並進行幼苗耐鹽性等級調查。耐鹽等級，則參考 Jwo *et al.* (2008) 修改自 IRRI 在 2002 年所定鹽害分級標準之水稻標準評估系統 (Standard Evaluation System for Rice; SES) 手冊進行 (圖 2)。

耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之調查：分子標幟輔助篩選並依譜系法繁殖所得之 BC_3F_2、BC_3F_3 及 BC_3F_4，於 BC_3F_2 與 BC_3F_3 世代，皆重複進行耐鹽性篩選，每一單株之子代挑選出最耐鹽單株繼續繁殖下一世代，最後乃純化得到 'ST3'、'ST12'、'ST16'、'ST18'、'ST59' 及 'ST90' 等 6 個 BC_3F_4 品系。再分別於三葉齡時期、五葉齡時期、七葉齡時期及最高分蘗期後等 4 個水稻不同生長階段進行鹽份逆境處理，並以耐鹽品系 'SM61' 與敏感型 'IR64' 做為對照。其中，前 3 個發育時期

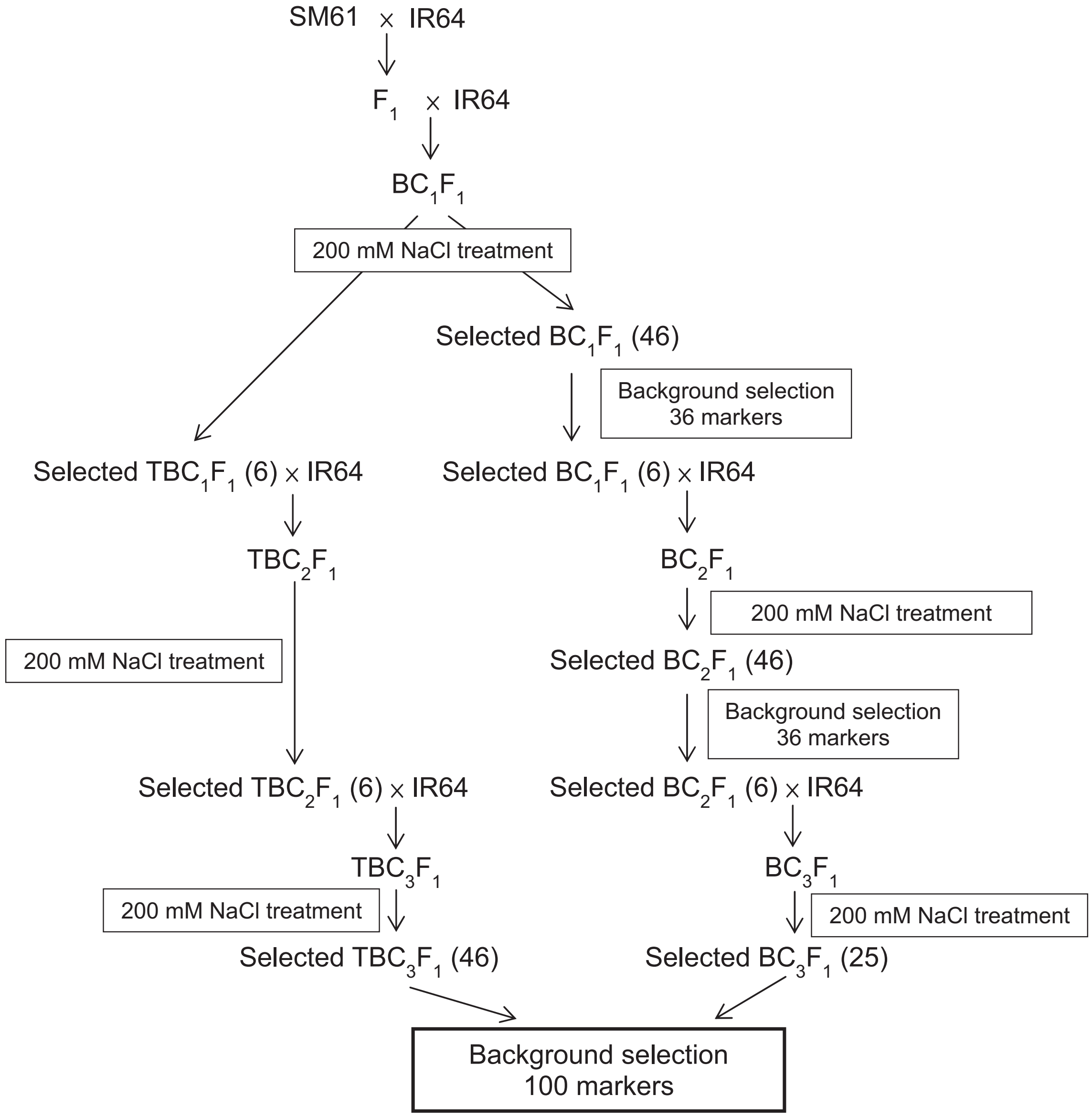

圖 1. 培育耐鹽 'IR64' 品系之回交育種流程，包含 200 mM NaCl 鹽分處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每個回交世代所挑選的植株數。

Fig. 1. Backcross breeding scheme of salt-tolerant lines 'IR64' with details of the treatment of 200 mM NaCl and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

係利用前述 80 孔栽培盤於不同發育階段以水耕方式進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理；而最高分櫱期之處理，則是利用直徑 26 cm，高度 20 cm 之圓形塑膠桶，於置入 16 cm 高之田土，而將秧苗移植並培育至最高分櫱期，再以 200 mM NaCl 溶液鹽分進行湛水處理，同時維持鹽水液面高於土面 1 cm。所有發育時期之試驗各品系之處理均以 10 株水稻幼苗為一重複單位，試驗二重複，以 RCBD 設計排列，並於植株間表現出差異之起始點開始至植株接近死亡階段，每日進行耐鹽等級調查。

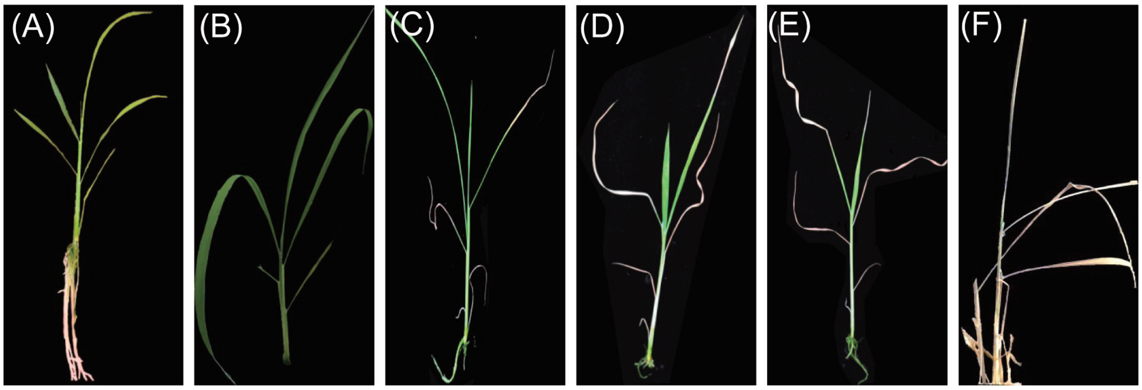

圖 2. 水稻秧苗期耐鹽等級調查標準。(A) 植株生長正常，耐鹽等級為 0；(B) 植株葉片捲曲或下位葉黃化，耐鹽等級為 1；(C) 植株葉片先端乾枯白化，耐鹽等級為 3；(D) 植株葉片約 1/2 乾枯白化，耐鹽等級為 5；(E) 植株葉片約 2/3 乾枯白化，耐鹽等級為 7；(F) 植株完全乾枯白化，耐鹽等級為 9。

Fig. 2. Standards used for evaluating salt-tolerance in rice seedlings. (A) When plant growth is normal, the scale of salt-tolerance is denoted 0; (B) some leaves are rolled or discolored, the scale of salt-tolerance is denoted 1; (C) some leaf tips are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 3; (D) about 1/2 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 5; (E) about 2/3 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 7; (F) and whole plant nearly dead and wilted, the scale of salt-tolerance is denoted 9.

分子標幟分析

水稻基因體之 DNA 萃取及多型性分子標幟篩選：水稻基因體 DNA 萃取採用 Kazuhiro *et al.* (1998) 發表 benzyl chloride 法之 DNA 萃取方式進行。而分子標幟係挑選 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選兩親本 ‘SM61’ 與 ‘IR64’ 間具多型性的分子標幟進行分析，並搭配自行設計之 indel 分子標幟填補不足位置，而 indel 的設計則是根據 Shen *et al.* (2004) 所發表 indel 存在位置進行相關引設計。

PCR 反應、電泳分析及基因型判讀：PCR 反應和電泳分析採用 Liao (2012) 發表的方式進行，於比對子代與親本在 PCR 反應擴增後之 DNA 片段大小，若電泳圖譜僅出現一個 DNA 條帶並與 ‘SM61’ 之條帶相同者，則此子代為同型合子，基因型紀錄為 A；只出現一個 DNA 條帶與 ‘IR64’ 之條帶相同，則此子代亦為同型合子，基因型紀錄為 B；同時出現兩個與兩親本相同之 DNA 條帶的子代，則為異型合子，基因型紀錄為 H。值得注意是，不管是 BC_1F_1、BC_2F_1 或 BC_3F_1 回交後代植株，其基因型分析只會出現同型合子 B 或是異型合子 H，若發現有回交後代基因型分析為同型合子 A，則視為自交種子，此單株乃進行淘汰。

遺傳相似度分析統計與連鎖圖譜之繪製：將基因型判讀結果利用 GGT graphical genotypes (GGT 2.0)/2007 EDITION 軟體 (http://www.plantbreeding.wur.nl/) 進行分析統計，以計算植株之遺傳相似度。並根據所挑選出在 ‘SM61’ 與 ‘IR64’ 間具備多型性的分子標幟在 RAP-DB 網站 IRGSP/RAP build 5 版所公布的 BAC/PAC 位置，推算換成 IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版所公佈 Nipponbare/Kasalath 雜交族群的連鎖圖譜位置，進一步將連鎖圖譜繪出。

結果

分子標幟輔助耐鹽水稻之選育

回交世代 (BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_3F_1) 之分子標幟背景選拔：各回交世代之秧苗經鹽分逆境處理後，其存活之 46 株秧苗利用分布在水稻 12 條染色體上，共 36 個分子標幟分別進行基因型判讀，其包括 25 個 SSR 分子標幟、4 個 STS 分子標幟及自行設計之 7 個 indel 分

子標幟 (表 1、圖 3)。結果 46 株 BC_1F_1 植株與 ‘IR64’ 的遺傳相似度介於 65–85% 之間，平均約為 75% (圖 4)；其中，與 ‘IR64’ 的相似度較高之 6 株，其與 ‘IR64’ 的遺傳相似度分別為 85.0、82.0、81.9、81.5、81.3 與 81.2%。此 6 個植株進一步移植於田間栽培，並於抽期穗供建立 BC_2F_1 之回交母本使用。同樣在 46 株耐鹽 BC_2F_1 回交後代之背景選拔上，其分子標幟除了重複使用獲選之 6 個 BC_1F_1 之基因型表現異結合之分子標幟外，如第 3 條染色體上的 RM8267、第 7 條染色體上的 RM234、第 8 條染色體上的 RM72、RI08030、SLS188 及第 11 條染色體上的 RM224，另加入不同於 BC_1F_1 背景選拔的 31 個多型性分子標幟，以避免特定基因體片段的重覆篩選，降低背景選拔效率。合計共使用分布在水稻 12 條染色體上的 36 個分子標幟，包括 24 個 SSR 分子標幟與自行設計之 12 個 indel 分子標幟 (表 1、圖 3)，結果 46 株 BC_2F_1 與 ‘IR64’ 的遺傳相似度介於 80.1–98.6% 之間，平均約 89% (圖 4)；其中，有 6 株與 ‘IR64’ 的遺傳相似度較高，其與 ‘IR64’ 的遺傳相似度分別為 98.6、94.9、94.3、94.0、94.0 與 93.9%，挑選此 6 株供做建立 BC_3F_1 之回交母本。最後 BC_3F_1 在經鹽分逆境處理後，乃挑選出 25 株耐鹽 BC_3F_1 回交後代，且為達到涵蓋整個水稻基因體的背景選拔效果，故挑選了 100 個分布於水稻 12 條染色體上的多型性分子標幟，包括 62 個 SSR 分子標幟、9 個 STS 分子標幟及自行設計之 29 個 indel 分子標幟，以此 100 個分子標幟進行 BC_3F_1 回交後代之基因型判讀 (表 1、圖 3)。結果顯示，此 25 株與 ‘IR64’ 的遺傳相似度平均達到 96.4% (圖 4)；其中，編號 1–5 單株之遺傳相似度均達 98% 以上 (表 2)，最高遺傳相似度之單株更可高達 99.2%。結果顯示，此 25 株 BC_3F_1 回交後代之遺傳背景，應已大致回復至輪迴親 ‘IR64’ 之遺傳背景。

傳統育種回交對照：在傳統育種回交之對照族群的試驗中，TBC_1F_1、TBC_2F_1 及 TBC_3F_1 各世代均只經鹽分逆境處理，而不經分子標幟輔助分析及選拔，並於 TBC_3F_1 世代選取 46 株耐鹽植株，利用 MAS 之 BC_3F_1 植株背景選拔相同之 100 個分子標幟進行背景分析 (表 1、圖 3)。此 46 株與 ‘IR64’ 的遺傳相似度平均達到 93.8% (圖 4)；其中，編號 1–10 之回交單株，其與輪迴親之遺傳相似度可高達 97%。顯示在未經分子標幟輔助背景選拔下，仍可利用傳統回交方式，選育與輪迴親相近之材料，而 TBC_3F_1 世代之各單株分子層次資訊則如表 3 所示。再者，相對於經過 MAS 所選拔之 BC_3F_1 植株的 96.4%，明顯可看出經由分子標幟的輔助選拔，確實有效提高了回交後代恢復輪迴親之速度，有利於耐鹽水稻育種效率和準確性之提升。

耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之評估

MAS 獲選所得之 6 個 BC_3F_4 品系，分別於三葉齡、五葉齡、七葉齡及最高分蘗期等 4 個時期進行耐鹽性評估，藉以確認耐鹽品系在不同發育時期之耐鹽性穩定性，結果如表 4 所示。在三葉齡時期，處理第 2 日各品系在耐鹽等級上之表現即出現差異，因此開始進行植株耐鹽等級調查直至第 12 日 (圖 5A)。以 10 株植株表現的耐鹽等級取平均值，發現除了品系 ‘ST12’、‘ST18’ 和 ‘ST59’，其餘部分品系在鹽份逆境處理下第 4 日已達到 5 級，而在處理第 7 日後所有品系則皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，各品系間耐鹽表現之差異未達顯著水準，顯示品系間並無顯著差異 (表 4)。

在五葉齡時期，植株在第 6 日葉片出現鹽分處理反應差異，故開始進行耐鹽等級調查，調查每日的植株耐鹽等級直至第 17 日 (圖 5B)。然由於環境氣候不穩定，使得所有品系植株在第 6 日耐鹽等級皆表現 3 級以上，敏感型的 ‘IR64’ 更是表現 5 級以上。而在第 9 日，所有品系皆達 5 級以上，‘IR64’ 則達到了 7 級，並在第 11 日，所有品系皆達到 7 級以上。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，分別在第 6、7、8、9、11、15 及 17 日均出現顯著差異。各品系間的耐鹽表現在變方分析達顯著後，繼續進行多

表 1. 在 'SM61' 與 'IR64' 間具多型性的分子標幟，其應用於背景選拔之數量。

Table 1. The number of polymorphic markers between 'SM61' and 'IR64' used for background selection.

Backcross generation	Chromosome	Genetic marker			
		SSR	STS	Indel	Subtotal
BC_1	1	1	1	1	3
	2	3	0	0	3
	3	1	1	1	3
	4	1	1	1	3
	5	2	0	0	2
	6	2	0	1	3
	7	3	0	0	3
	8	3	0	2	5
	9	3	1	0	4
	10	2	0	0	2
	11	2	0	1	3
	12	2	0	0	2
	Total	25	4	7	36
BC_2	1	3	0	0	3
	2	2	0	1	3
	3	2	0	1	3
	4	2	0	1	3
	5	2	0	1	3
	6	3	0	0	3
	7	2	0	1	3
	8	1	0	2	3
	9	1	0	2	3
	10	2	0	1	3
	11	2	0	1	3
	12	2	0	1	3
	Total	24	0	12	36
BC_3	1	12	2	4	18
	2	7	0	4	11
	3	6	2	3	11
	4	6	1	1	8
	5	5	1	2	8
	6	4	2	1	7
	7	5	0	2	7
	8	1	0	7	8
	9	3	0	1	4
	10	5	0	2	7
	11	4	0	1	5
	12	4	1	1	6
	Total	62	9	29	100

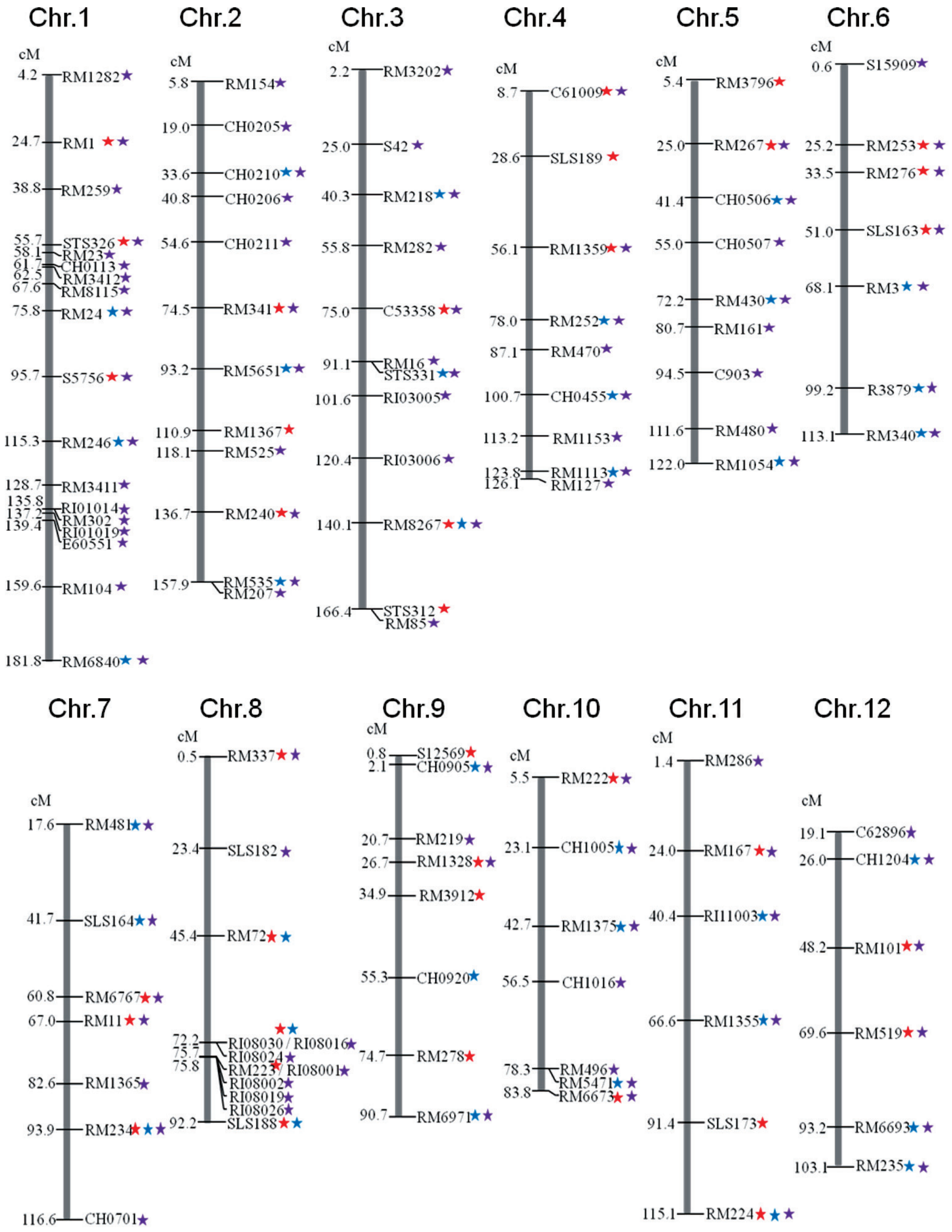

圖 3. 使用於背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 36 個分子標幟於 BC_1F_1 背景選拔 (紅色星型)、36 個分子標幟於 BC_2F_1 背景選拔 (藍色星型) 及 100 個分子標幟於 BC_3F_1 背景選拔 (紫色星型)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、R 或 S 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

Fig. 3. The polymorphic markers used for background selection. There are thirty-six markers indicated by red stars, 36 markers indicated by blue stars, and 100 markers indicated by purple stars and were applied to BC_1F_1, BC_2F_1, and BC_3F_1, respectively, for background selection. The prefixes RM indicates SSR markers; C, R and S indicate STS markers; CH, STS, SLS and RI indicate indel markers.

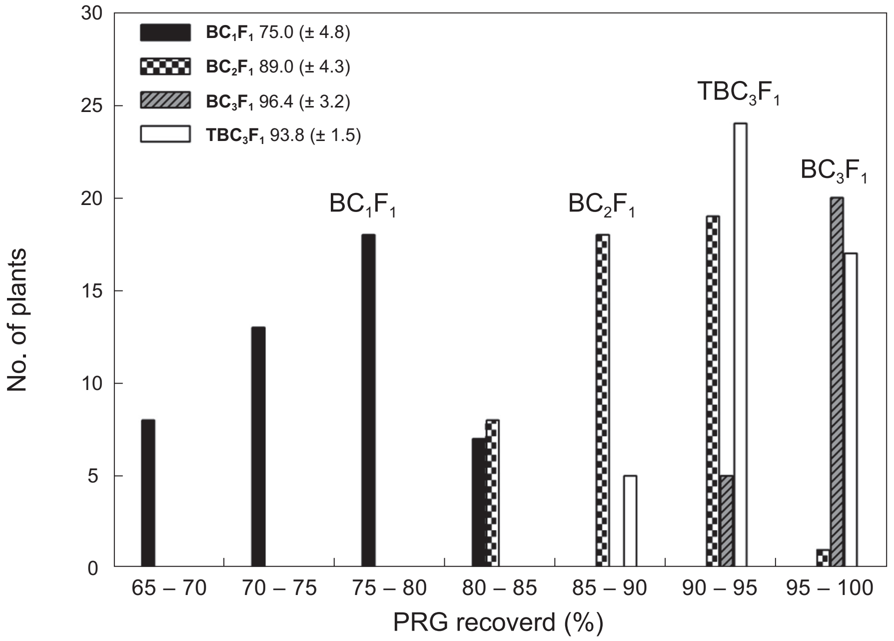

圖 4. SM61/IR64 分子標幟輔助回交育種後代族群 BC_1F_1、BC_2F_1 和 BC_3F_1 及傳統回交育種後代族群 TBC_3F_1 回復輪迴親 'IR64' 基因體比率之頻率分布。圖形符號右邊之數值為族群平均輪迴親基因體回復比率，括弧內數值為標準差。

Fig. 4. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC_1F_1, BC_2F_1 and BC_3F_1 populations and conventional backcrossing in TBC_3F_1 population derived from the backcross of 'SM61'/'IR64'. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered (± SD) in each generation.

重比較，結果發現以 'ST18' 耐鹽性表現最佳，而 'ST12'、'ST59' 和 'ST90' 也是偏向表現較佳的耐鹽特性 (表 4)。

在七葉齡時期，植株在第 4 日表現出耐鹽等級差異，故開始進行耐鹽等級調查，調查每日的植株耐鹽等級直至第 15 日 (圖 5C)。所有品系在第 9 日皆達到 5 級以上，在第 13 日達到 7 級以上。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，分別在第 5、6、7、9、12 及 13 日出現顯著差異。同樣再經多重比較結果，發現以 'ST12' 和 'SM61' 耐鹽性表現最佳 (表 4)，而在三葉齡和五葉齡時期表現最佳的 'ST18'，雖然在七葉齡不是最佳表現，但是其耐鹽性相對於其他品系，仍是偏向表現較佳的耐鹽特性。最後，植株在快達最高分蘗期時開始停止灌水，等到土面呈現乾枯龜裂後，再開始灌入 200 mM NaCl 的鹽水進行鹽分逆境處理，在第 10 日表現出耐鹽等級差異。開始進行植株耐鹽等級調查直至第 30 日 (圖 5D)，所有品系在第 14 日皆達到 5 級以上，在第 28 日達到 7 級以上，品系 SM61 更在第 30 日達到 9 級，即全部植株完全白化枯死。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，而多重比較結果則發現以 'ST18' 和 'ST59' 耐鹽性表現最佳 (表 4)。

綜觀此 6 種耐鹽品系在 4 個水稻不同生長階段對鹽分逆境下的表現，以 'ST18' 為最優良耐鹽品系，在其中 3 個時期都有表現出高耐鹽特性；而耐鹽品系 'SM61' 在七葉齡時期的耐鹽性，表現相對於三葉齡和五葉齡較佳。由初步結果推測，'SM61' 所帶有的耐鹽基因，可能在植株七葉齡時期的鹽分逆境下才開始基因的表現。

表 2. 以 100 個分子標幟於 MAS 分析 BC_3F_1 之基因體組成。

Table 2. The genome composition of BC_3F_1 by 100 polymorphic markers used for marker-assisted selection (MAS).

Individual[z]	A (%)[y]	B (%)[x]	H (%)[w]	- (%)[v]	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
IR64	0	100	0	0	100	1,359.7	0	0
1	0	98.3	1.7	0	99.2	1,359.7	3	2
2	0	97.7	2.3	0	98.9	1,359.7	3	2
3	0	96.3	3.7	0	98.2	1,359.7	3	2
4	0	96.0	4.0	0	98.0	1,359.7	4	2
5	0	96.0	4.0	0	98.0	1,359.7	3	2
6	0	95.6	4.4	0	97.8	1,359.7	4	2
7	0	96.2	2.7	1.1	97.6	1,359.7	7	3
8	0	94.6	5.4	0	97.3	1,359.7	4	2
9	0	94.4	5.6	0	97.2	1,359.7	3	2
10	0	93.2	6.8	0	96.6	1,359.7	5	3
11	0	93.2	6.8	0	96.6	1,359.7	5	3
12	0	95.2	2.6	2.3	96.5	1,359.7	8	3
13	0	94.5	4.0	1.6	96.5	1,359.7	4	1
14	0	93.0	7.0	0	96.5	1,359.7	9	5
15	0	93.0	7.0	0	96.5	1,359.7	4	2
16	0	92.5	7.5	0	96.3	1,359.7	4	2
17	0	92.2	7.8	0	96.1	1,359.7	5	3
18	0	90.9	9.1	0	95.5	1,359.7	10	5
19	0	91.6	7.6	0.8	95.4	1,359.7	10	4
20	0	91.8	6.8	1.4	95.2	1,359.7	16	4
21	0	89.7	10.3	0	94.9	1,359.7	12	6
22	0	89.5	10.5	0	94.8	1,359.7	9	5
23	0	88.9	11.1	0	94.5	1,359.7	4	2
24	0	89.0	9.4	1.6	93.7	1,359.7	7	3
25	0	87.9	11.1	0.9	93.5	1,359.7	11	5
SM61	100	0	0	0	0	1,359.7	0	0

[z] Arranged by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percent of 'SM61' genome.
[x] The percent of 'IR64' genome.
[w] The percent of heterozygote.
[v] The percent of missing data.
[u] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

耐鹽品系初級和高級產量試驗

初級產量試驗：在 BC_3F_2 世代經耐鹽處理後存活的植株，移植於田間並經自交後進行單株收穫，由 BC_3F_2 耐鹽性表現挑選出 'ST1' 至 'ST20' 個品系進行初級產量試驗，結果如表 5 所示。此 20 個耐鹽品系中，其稻穀產量表現先換算成每株稻穀收穫重量，再依一般田間種植每公頃 220,000 株數量加乘，得到每品系每公頃的產量。結果各品系產量介於 3,090–6,670 kg ha^{-1}，其中以 'ST1'、'ST2'、'ST3'、'ST7'、'ST9'、'ST10'、'ST11'、'ST14'、'ST17' 等 9 個品系稻穀產量均高於 5,000 kg ha^{-1}，產量分別為 6,670、6,109、5,990、5,110、5,080、5,790、5,300、5,240

表 3. 以 100 個分子標幟分析 TBC_3F_1 之基因體組成。

Table 3. The genome composition of TBC_3F_1 by 100 polymorphic markers.

Individual[z]	A (%)[y]	B (%)[x]	H (%)[w]	- (%)[v]	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
IR64	0	100	0	0	100	1,359.7	0	0
1	0	96.7	3.3	0	98.4	1,359.7	3	2
2	0	96.3	3.7	0	98.2	1,359.7	3	2
3	0	96.0	4.0	0	98.0	1,359.7	2	1
4	0	95.6	4.4	0	97.8	1,359.7	5	3
5	0	95.4	4.6	0	97.7	1,359.7	1	1
6	0	97.2	0.8	2.0	97.6	1,359.7	5	1
7	0	95.0	5.0	0	97.5	1,359.7	5	3
8	0	94.4	5.6	0	97.2	1,359.7	2	1
9	0	94.3	5.7	0	97.2	1,359.7	8	4
10	0	94.1	5.9	0	97.1	1,359.7	6	3
11	0	93.5	6.5	0	96.8	1,359.7	7	4
12	0	93.2	6.8	0	96.6	1,359.7	4	2
13	0	93.0	7.0	0	96.5	1,359.7	9	5
14	0	92.3	7.7	0	96.2	1,359.7	8	4
15	0	92.2	7.8	0	96.1	1,359.7	9	5
16	0	91.9	8.1	0	96.0	1,359.7	8	4
17	0	92.5	6.5	1.0	95.8	1,359.7	8	3
18	0	91.1	7.1	1.7	94.7	1,359.7	12	5
19	0	89.0	11.0	0	94.5	1,359.7	6	3
20	0	88.9	11.1	0	94.5	1,359.7	9	5
21	0	88.3	11.7	0	94.2	1,359.7	11	6
22	0	87.8	12.2	0	93.9	1,359.7	7	4
23	0	88.6	10.0	1.4	93.6	1,359.7	9	4
24	0	86.6	13.4	0	93.3	1,359.7	8	4
25	0	86.4	13.6	0	93.2	1,359.7	8	4
26	0	88.8	8.7	2.6	93.2	1,359.7	8	3
27	0	86.2	13.8	0	93.1	1,359.7	8	4
28	0	86.1	13.9	0	93.1	1,359.7	13	7
29	0	85.7	14.3	0	92.9	1,359.7	10	5
30	0	85.6	14.4	0	92.8	1,359.7	6	3
31	0	85.8	13.3	0.9	92.5	1,359.7	11	5
32	0	84.6	15.4	0	92.3	1,359.7	7	4
33	0	84.5	15.5	0	92.3	1,359.7	13	7
34	0	84.1	15.9	0	92.1	1,359.7	9	5
35	0	85.7	12.2	2.1	91.8	1,359.7	11	4
36	0	89.3	4.9	5.8	91.8	1,359.7	20	5
37	0	83.0	17.0	0	91.5	1,359.7	8	4
38	0	82.9	17.1	0	91.5	1,359.7	10	5
39	0	81.1	18.9	0	90.6	1,359.7	10	5

表 3.　以 100 個分子標幟分析 TBC_3F_1 之基因體組成。(續)

Table 3. The genome composition of TBC_3F_1 by 100 polymorphic markers. (continued)

Individual[z]	A (%)[y]	B (%)[x]	H (%)[w]	- (%)[v]	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
40	0	83.2	14.2	2.6	90.3	1,359.7	9	4
41	0	83.7	12.8	3.5	90.1	1,359.7	20	6
42	0	86.0	7.3	6.8	89.7	1,359.7	16	2
43	0	79.1	20.9	0	89.6	1,359.7	7	4
44	0	84.0	7.7	8.3	87.9	1,359.7	18	3
45	0	74.3	24.4	1.3	86.5	1,359.7	13	6
46	0	71.2	28.8	0	85.6	1,359.7	13	7
SM61	100	0	0	0	0	1,359.7	0	0

[z] Arranged by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percent of ‘SM61’ genome.
[x] The percent of ‘IR64’ genome.
[w] The percent of heterozygote.
[v] The percent of missing data.
[u] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

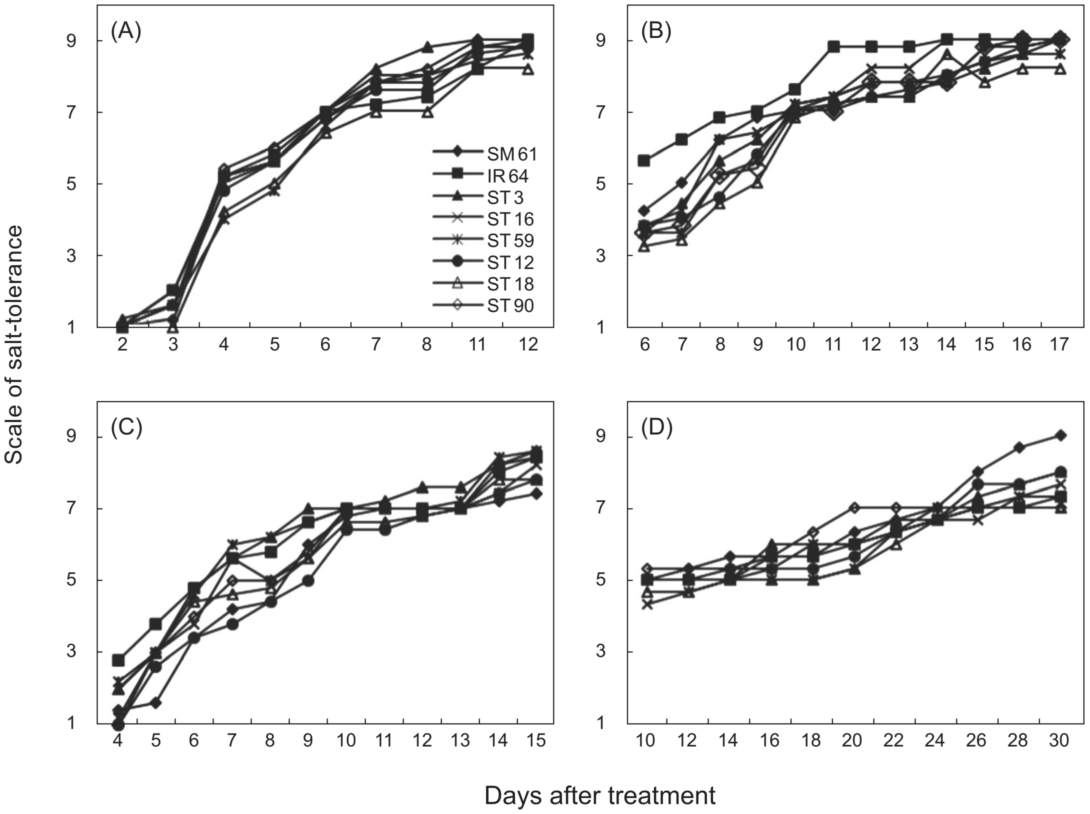

圖 5.　耐鹽品系 ‘SM61’、感鹽品種 ‘IR64’ 及六個 ‘SM61’/‘IR64’ 回交後代 BC_3F_4 耐鹽品系於 (A) 三葉齡；(B) 五葉齡；(C) 七葉齡及 (D) 最高分蘗期後進行 200 mM 氯化鈉鹽分逆境處理下之耐鹽等級變化。

Fig. 5. The salt-tolerance scale evaluated by salt-tolerant line ‘SM61’, salt-susceptible variety ‘IR64 and six BC_3F_4 salt-tolerant lines derived from the backcross of ‘SM61’/‘IR64’ at (A) three-leaf, (B) five-leaf, (C) seven-leaf, and (D) after maximum tillering stages under the treatment of 200 mM NaCl.

表 4. ‘IR64’ 和 7 個耐鹽品系於 4 個不同生長期進行 200 mM 氯化鈉鹽份逆境處理下之耐鹽等級表現。

Table 4. The scale of salt-tolerance in ‘IR64’ and seven salt-tolerant lines under the treatment of 200 mM NaCl at four growing stages.

Stage	Line or variety	Scale of salt-tolerance[z] – Days after treatment																												
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Three-leaf seedling	SM61	1.0	1.2	5.2	5.6	6.8	7.8	7.8			8.6	8.8																		
	IR64	1.0	2.0	5.2	5.8	7.0	7.2	7.4			8.2	9.0																		
	ST3	1.2	1.6	5.2	5.6	7.0	8.2	8.8			9.0	9.0																		
	ST16	1.0	2.0	5.0	5.6	7.0	8.0	8.0			8.8	9.0																		
	ST59	1.0	1.6	4.0	4.8	6.6	7.8	8.0			8.4	8.6																		
	ST12	1.0	1.6	4.8	5.6	6.8	7.6	7.6			8.8	8.8																		
	ST18	1.0	1.0	4.2	5.0	6.4	7.0	7.0			8.2	8.2																		
	ST90	1.0	1.6	5.4	6.0	7.0	7.8	8.2			9.0	9.0																		
Five-leaf seedling	SM61					4.2 b	5.0 b	6.2 ab	6.8 ab	7.0	7.0 b	7.4	7.6	7.8	8.8 ab	8.8	9.0 a													
	IR64					5.6 a	6.2 a	6.8 a	7.0 a	7.6	8.8 a	8.8	8.8	9.0	9.0 a	9.0	9.0 a													
	ST3					3.6 bc	4.4 bc	5.6 bc	6.2 bcd	7.2	7.4 b	7.8	7.8	7.8	8.2 bc	8.6	9.0 a													
	ST16					3.8 bc	4.2 bc	6.2 ab	6.4 abc	7.0	7.4 b	8.2	8.2	9.0	9.0 a	9.0	9.0 a													
	ST59					3.6 bc	3.6 c	5.2 cd	5.6 def	7.2	7.4 b	7.8	7.8	8.0	8.4 abc	8.6	8.6 ab													
	ST12					3.8 bc	4.0 bc	4.6 d	5.8 cde	7.0	7.2 b	7.4	7.4	8.0	8.4 abc	8.8	9.0 a													
	ST18					3.2 c	3.4 c	4.4 d	5.0 f	6.8	7.2 b	7.4	7.4	8.6	7.8 c	8.2	8.2 b													
	ST90					3.6 bc	3.8 c	5.2 cd	5.4 ef	7.0	7.0 b	7.8	7.8	7.8	8.8 ab	9.0	9.0 a													
Seven-leaf seedling	SM61			1.4	1.6 c	3.4 c	4.2 c	4.4	6.0 abc	6.8	7.0	7.0 b	7.0 b	7.2	7.4															
	IR64			2.8	3.8 a	4.8 a	5.6 ab	5.8	6.6 ab	7.0	7.0	7.0 b	7.0 b	8.0	8.4															
	ST3			2.0	3.0 ab	4.8 a	5.6 ab	6.2	7.0 a	7.0	7.2	7.6 a	7.6 a	8.2	8.4															
	ST16			1.2	3.0 ab	3.8 bc	5.6 ab	5.0	5.6 bc	7.0	7.0	7.0 b	7.0 b	7.4	8.2															
	ST59			2.2	3.0 ab	4.6 ab	6.0 a	6.2	6.6 ab	7.0	7.0	7.0 b	7.2 b	8.4	8.6															
	ST12			1.0	2.6 b	3.4 c	3.8 c	4.4	5.0 c	6.4	6.4	6.8 b	7.0 b	7.4	7.8															
	ST18			2.0	3.0 ab	4.4 ab	4.6 bc	4.8	5.6 bc	6.6	6.6	6.8 b	7.0 b	7.8	7.8															
	ST90			1.0	3.0 ab	4.0 abc	5.0 abc	5.0	5.8 bc	7.0	7.0	7.0 b	7.0 b	8.2	8.6															
After maximum tillering	SM61									5.0		5.3		5.7		5.7		5.7 ab		6.3		6.7		7.0		8.0		8.7		9.0
	IR64									5.0		5.0		5.0		5.7		5.7 ab		6.0		6.3		6.7		7.0		7.0		7.3
	ST3									5.0		5.0		5.0		6.0		6.0 a		6.0		6.7		6.7		7.3		7.7		8.0
	ST16									4.3		4.7		5.0		5.3		6.0 a		6.0		6.3		6.7		6.7		7.3		7.7
	ST59									5.0		5.0		5.0		5.0		5.0 c		5.3		6.3		7.0		7.0		7.3		7.3
	ST12									5.0		5.0		5.3		5.3		5.3 bc		5.7		6.3		6.7		7.7		7.7		8.0
	ST18									4.7		4.7		5.0		5.0		5.0 c		5.3		6.0		6.7		7.0		7.0		7.0
	ST90									5.3		5.3		5.3		5.7		6.3 a		7.0		7.0		7.0		7.0		7.0		7.0

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

表 5. 2011 年二期作 20 個耐鹽品系初級稻穀試驗之稻穀產量表現。

Table 5. The grain yield of twenty rice salt-tolerant lines in preliminary yield trial in the second cropping season of 2011.

Line	Grain yield (kg ha^{-1})	Line	Grain yield (kg ha^{-1})
ST1	6,670	ST11	5,300
ST2	6,100	ST12	4,750
ST3	5,990	ST13	4,460
ST4	3,090	ST14	5,240
ST5	4,700	ST15	4,790
ST6	4,580	ST16	4,550
ST7	5,110	ST17	5,710
ST8	4,760	ST18	4,950
ST9	5,080	ST19	4,670
ST10	5,790	ST20	3,110

及 5,710 kg ha^{-1}，為產量潛能較高之品系，並以 ‘ST1’ 及 ‘ST2’ 為最高產品系。而 ‘ST4’ 及 ‘ST20’ 之稻穀產量，僅為 3,090 kg ha^{-1} 及 3,110 kg ha^{-1}，係 20 個耐鹽品系中較為低產潛能者。另外，於耐鹽性最優良的品系 ‘ST18’，其產量亦達 4,950 kg ha^{-1}。

高級產量試驗：20 個耐鹽品系一期作之高級產量試驗結果如表 6 所示，其稻穀產量表現介於 5,160 kg ha^{-1} 至 7,530 kg ha^{-1}，其中以 ‘ST1’、‘ST2’、‘ST3’、‘ST4’、‘ST5’、‘ST9’、‘ST10’、‘ST11’、‘ST12’、‘ST14’、‘ST16’、‘ST20’ 等 12 個品系之稻穀產量高於 6,000 kg ha^{-1} 以上，係稻穀產量潛能較佳之品系，並以 ‘ST2’ 及 ‘ST5’ 兩品系之稻穀產量最高，分別可達到 7,530 及 7,400 kg ha^{-1}；而 ‘ST18’、‘ST19’ 兩品系之稻穀產量分別為 5,160 kg ha^{-1} 及 5,230 kg ha^{-1}，其是 20 個耐鹽品系中稻穀產量表現較差異之品系。

20 個耐鹽品系二期作之高級產量試驗結果，同樣如表 6 所示，其稻穀產量表現介於 4,660 至 7,370 kg ha^{-1}。其中，除 ‘ST4’ 之稻穀產較低外，僅 4,660 kg ha^{-1}，其餘 18 個耐鹽品系之稻穀產量均高於 5,000 kg ha^{-1} 以上，並 以 ‘ST2’、‘ST5’、‘ST9’、‘ST15’、‘ST17’ 等 5 個品系之稻穀產量高於 6,000 kg ha^{-1} 以上，係稻穀產量潛能較佳之品系。更以 ‘ST2’ 品系之稻穀產量最高，達到 7,370 kg ha^{-1}，而輪迴親親本 ‘IR64’ 稻穀產量為 7,090 kg ha^{-1}。

耐鹽回交品系與 IR64 性狀間之差異：1012 年二期同時種植 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘IR64’ 各 750 株，二重複，進行台灣水稻品種權申請時於品種性狀表中所之 70 個性狀，藉以了解育成回交育成品系與輪迴親在農藝特性間差異。

討論

分子標幟輔助選拔

一般傳統回交育種在族群數量龐大的情況下，回交後代植株基因型在 BC_1 世代回復到輪迴親基因體的比率為 75%，在 BC_2 世代為 87.5%，在 BC_3 世代為 93.8%。但在實際回交育種操作過程中，通常會因族群數量較小或親本遺傳背景較遠，使得回交世代回復到輪迴親基因體的比率較理論值低 (Collard *et al.* 2005)。本試驗傳統回交育種結果，在 BC_3 世代回復到輪迴親基因體的比率為 93.8%，剛好達到了預期的結果，代表所使用的回交後代數量是足夠的。

Frisch *et al.* (1999, 2000) 藉由玉米 (*Zea mays* L.) 基因圖譜上的 80 個分子標幟，利用 PLABSIM 程式模擬玉米族群在回交過程中，將貢獻親本上的一個目標對偶基因轉入輪迴親本之輪迴親基因體回復比率。結果指出，利用分子標幟輔助回交育種的輪迴親基因體回復比率，遠高於一般傳統回交育種；再從模擬曲線圖來看，分子標幟輔助回交育種的輪迴親基因體回復比率在 BC_1 世代約 72%、BC_2 世代約 88%、BC_3 世代約 95%，而本試驗結果為在 BC_1 世代約 75%、BC_2 世代約 89%、BC_3 世代約 96.4%。顯示 3 個回交世代皆達到了預期的比率，代表回交後代數量及所使用於背景選拔的分子標幟數量是足夠的。另外，由 Collard *et al.* (2005) 報告指出，一般傳統回交育種至少需經過 6 至 8 次的回交，才能夠幾乎回復到輪迴親的基因體，但藉由分子標幟輔助回交育種，只需回交 4 次或 3

表 6.　2012 年一期作 20 個耐鹽品系及二期作 ‘IR64’ 和 19 個耐鹽品系高級試驗之稻穀產量表現。

Table 6.　The grain yield of 20 salt-tolerant lines and ‘IR64’ and 19 salt-tolerant lines in advanced yield trials in the first and second cropping season of 2012.

Line	Grain yield of 1st crop (kg ha^{-1})[z]	Grain yield of 2nd crop (kg ha^{-1})[z]
ST1	6,950 abc	5,690 bcde
ST2	7,530 a	7,370 a
ST3	6,590 abcdef	5,980 bcd
ST4	6,010 cdefghi	4,660 f
ST5	7,400 ab	6,310 b
ST6	5,840 defghi	5,870 bcd
ST7	5,730 fghi	5,760 bcde
ST8	5,530 ghi	5,300 def
ST9	6,260 cdefg	6,090 bcd
ST10	6,760 abcde	5,760 bcde
ST11	6,800 abcd	5,640 bcde
ST12	6,510 bcdefg	5,300 def
ST13	5,760 efghi	5,010 ef
ST14	6,160 cdefghi	5,900 bcd
ST15	5,990 cdefghi	6,240 bc
ST16	6,770 abcd	5,860 bcd
ST17	5,830 defghi	6,360 b
ST18	5,160 i	5,430 cde
ST19	5,230 hi	5,870 bcd
ST20	6,180 cdefgh	-
IR64	-	7,090 a

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

次，甚至 2 次就可以達到此目標。故本研究預計回交 3 次的 BC_3F_1 回交後代，應已回復到接近輪迴親 IR64 的基因體，所以試著增加分子標幟至 100 個，以期達到涵蓋整個水稻基因體的背景選拔。而由 25 株的 BC_3F_1 回交後代基因型分析結果得知，其與 ‘IR64’ 的遺傳相似度平均達到 96.4%，其中最高單株更高達 99.2%。顯示此 25 株 BC_3F_1 回交後代，確實幾乎回復到 ‘IR64’ 的基因體。這些回交後代目前已繁殖至 BC_3F_5 世代，利用譜系法將單株純化繁殖成固定品系，在剔除異型結合之植株及持續純化後，透過田間實際的產量評估試驗，可了解這些獲選品系在栽培上的實用性。

Cheng *et al.* (2012) 利用耐鹽粳稻品種 ‘Xiushui09’ 與不耐鹽秈稻品系 ‘IR2061-520-6-9’ 雜交的 BC_2F_6 回交後代族群進行 QTLs 之圖譜定位，並藉由比較同一基因體背景，但在 QTLs 上帶有不同親本對偶基因的植株後代，其對偶基因在耐鹽性表現的貢獻上所顯現之差異。未來也可利用本試驗上的回交後代品系，進行耐鹽 QTLs 圖譜定位，期能定位並選殖出與耐鹽相關的基因。

耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之評估

Jwo *et al.* (2008) 針對 TNG 67 誘變品系在秧苗期約達 3 至 4 葉齡時期進行耐鹽性篩選，結果顯示水稻不同品種 (系) 對於鹽分逆境之反應不甚一致。部分品系在鹽分逆境早期有反應，部分則是反應在後期，而大部分品系鹽分逆境處理在第 5–7 d 與第 11–14 d 間產生劇烈轉折變化，鹽害指數由原先較低的

情形快速升高。本試驗同樣的在秧苗期約 3 葉齡時期進行耐鹽性篩選，結果發現鹽害指數則無明顯表現在特定時間點，但有偏向鹽害指數表現在秧苗早期發生較嚴重之情況。顯示水稻植株耐鹽性的表現，會因生育期不同而有所影響。究其原因，Jwo *et al.* (2008) 在整個測試過程所使用之鹽分逆境僅 150 mM NaCl，且測試期間達 21 日，在 21 日的過程中可能因參試材料的生長、發育或修復機制不同，故容易造成二個不同鹽害反應時期的轉折變化。而本次試驗以較高之 200 mM NaCl 鹽分逆境在 12 日完成，由於鹽分逆境相對較高，植株受傷較重。因此參試材料繼續生育、發育或修復損傷之情形，相對會減少，故調查過程之耐鹽等級表現較不會發生劇烈轉折變化的現象。

檢視參試 8 個品種 (系) 的耐鹽表現來看，在 5 葉齡、7 葉齡及最高分蘗期後鹽分逆境處理結果，顯示 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ (7 葉齡除外) 等 3 個品系在耐鹽性有不錯之表現，較之對照品種 ‘IR64’ 的表現均有明顯的差異。尤其 ‘SM61’ 因初期發育較慢，雖已提早 7 日育苗，於植株達到適當葉齡後所進行之耐鹽測試，其所表現之耐鹽反應仍不及分子標幟選育之 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ 等 3 個品系。又因 ‘SM61’ 之根系發育較小，故帶有耐鹽基因之 MAS 回交品系，諸如 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ 可能因根系發育優於貢獻親，使得其在鹽分逆境之耐受能力表現上優於 ‘SM61’。試驗結果顯示，回交品系在背景為秈稻的基礎下，由於生長勢、農藝特性及根系較為優良，使得獲選品系有超越貢獻親耐鹽性的情形發生，大幅提高了 MAS 及傳統回交育種獲選之耐鹽品系之實用性。

回交後代品系之耐鹽性表現，在不同生育時期超越貢獻親 (‘SM61’) 之表現，其耐鹽性之超越親本的現象是否可能是因 ‘SM61’ 的基因組與 ‘IR64’ 基因組產生互補所造成，抑或是耐鹽基因 ‘IR64’ 遺傳背景存在轉錄、調節等因子，形成增加 ‘SM61’ 耐鹽基因的表現。其關於前者，由於目前並無報告指出耐鹽品種雜交回交後代因基因組互補而產生耐鹽性增加的報告，因此本研究分子標幟輔助導入耐鹽性結果，只能推論因 ‘SM61’ 的耐鹽基因導入 ‘IR64’，故造成 ‘IR64’ 回交品系出現耐鹽性。惟從大部分耐旱性 QTLs 圖譜定位的研究中，發現在秈稉稻雜交族群中，經圖譜定位到之 QTLs 對耐旱性之正向貢獻主要來自稉稻。原因係稉型稻於少雨地區栽培，故而其遺傳形質上較為耐旱 (Wang *et al.* 1994; Redona & Mackil 1996; Yano & Sasaki 1997)。由此逆境特性 QTLs 結果推論，似乎不同基因組的互補對逆境特性表現產生正向影響，具有相當可能性。惟是否 ‘IR64’ 遺傳背景存在可增進 ‘SM61’ 的耐鹽基因表現，仍有待再進一步試驗確認。然由不同回交品系之耐鹽特性有些較強 (3 級)，但有些品系之表現為 5 級觀之，未來應可以不同耐鹽性等級之回交品系，再進一步進行回交，以育成 ‘IR64’ 不同耐鹽等級同源系 (isogenic line)。在剔除回交品系於農藝特性表現差異之因素後，其同源系在耐鹽性上所表現之差異，將可清楚歸類為 ‘IR64’ 遺傳背景與 ‘SM61’ 耐鹽基因間之交感效應或互補性所造成。

水稻耐鹽性在秧苗期和生殖生長期是由不同機制所控制 (Moradi *et al.* 2003)，目前最為人所知的耐鹽 *Saltol* QTL 和 *SKC1* 基因都是在秧苗期表現，而本試驗也主要針對水稻秧苗期的耐鹽性表現進行觀察。所以，未來必須結合在水稻不同生長期表現耐鹽性的 QTLs，以因應水稻於實際田間完整生育期對耐鹽環境變化的適應。

耐鹽品系產量比較試驗

台灣水稻一期作稻穀產量約介於 5,000–7,000 kg ha^{-1}，而二期作則介於 4,000–6,000 kg ha^{-1}。一般而言，一期作稻穀產量較高，產量平均約 6,000 kg ha^{-1}，而二期作較為減少，稻穀產量約 5,000 kg ha^{-1}。在耐鹽品系初級產量試驗中，發現 20 個耐鹽品系的產量僅 9 個品系達到 5,000 kg ha^{-1} 以上的標準，即 ‘ST1’、‘ST2’、‘ ST3’、‘ST7’、‘ST9’、‘ST10’、‘ST11’、‘ST14’ 和 ‘ST17’，而超過一半以上的試驗品系 (11 個品系) 未達到此一產量標準；

其中，更以 'ST4' 和 'ST20' 兩品系產量最低，產量僅約 3,000 kg ha^{-1}。推測可能原因在於初級產量試驗時，由於水稻穀粒充實時期發生嚴重田間病蟲害，導致稻穀產量減少，植株稔實率偏低，致使各耐鹽品系之產量無法充分表現。另一個可能原因，係分子輔助回交過程可能由於部分與高產相關之基因可能被遺失，而未回復至 'IR64' 基因體，致使產量潛能相對偏低。這些低產品系，未來仍有待進一步改進產量表現，方能進行實際利用。

在耐鹽品系的高級產量比較試驗中，各品系之水稻植株在田間生長正常，病蟲害發生率低。經試驗結果得知，全部 20 個品系的稻穀產量皆達到 5,000 kg ha^{-1} 以上，其中有 12 品系之稻穀產量均高於 6,000 kg ha^{-1}；以 'ST2' 及 'ST5' 最具高產潛能，而 'ST2' 之稻穀產量高達 7,530 kg ha^{-1}，顯示已具有實際栽培價值。至於二期作產量表現，雖然大部分品系均達 5,000 kg ha^{-1}，雖亦具有實際栽培價值，然與輪迴親 'IR64' 相較，乃僅 'ST2' 與 'IR64' 稻穀產量差異不顯著，其餘耐鹽品系之稻穀產量表現仍低於輪迴親 'IR64'。進一步對照高級產量試驗可知，'ST2'、'ST3' 及 'ST5' 等 3 個品系在兩期作均表現高產，顯示此 3 個品系未來適合在台灣地區兩期作栽培利用，尤其 'ST2' 兩期作之稻穀產量表現均為最佳，顯示其具有相當高產的潛能，實用栽培價值令人期待。

上述耐鹽品系產量試驗結果符合吾人之期望，顯示可藉由回交育種方式快速育成耐鹽品系。固然增加耐鹽特性的過程中，可能會使得稻穀產量稍有降低情形，然所選育之品系大部分均可達到實用栽培之價值。因此，展望未來台灣水稻耐逆境育種，應可循此模式於 3–4 年內選育出適合國內栽培利用之耐逆境水稻新品種，以因應全球暖化下糧食生產需求。再者，在耐鹽品系 (BC_3F_4) 不同發育時期耐鹽性評估試驗中，以 'ST12' 及 'ST18' 之耐鹽性表現較佳，然由高級產量試驗中卻發現兩品系之稻穀產量表現不如預期，究其原因是否在分子標幟輔助回交過程中發生產量相關基因的遺失而無法表現產量潛能，或由於產量試驗係於正常水田無鹽分影響情形下進行，致使高耐鹽品系諸如 'ST12' 及 'ST18' 之產量潛能因評估環境為非鹽化田，致使其優良特性無法充份發揮，尚待進一步觀察、測試與釐清。

綜合各品系在不同發育時期表現出優良耐鹽性，且產量試驗稻株發育正常並具有不錯的產量表現來看，本研究確已利用分子標幟輔助回交的方式，於短期內有效進行耐鹽性之轉移及選育工作。因此，可提供國內未來於架構水稻耐逆境育種之策略與操作時參考與利用，尤其國內西部沿海或部分超抽地下水導致海水鹽分入侵之土地，諸如台南地區之學甲、將軍、北門及鰲鼓等接近海岸地區。這些土地由於鹽化影響，導致相當比率土地無法種植農作物，若能以選育之耐鹽品系直接於鹽化土地進行產量及實用性測試，進一步確認其等實用性，即可培育出耐鹽水稻新品種。本研究選育所得之耐鹽品系，未來於台灣鹽化土地之栽培利用，具有令人期待之前景。

引用文獻

Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, E. R. Angeles, Q. Qian, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science 309:741–745.

Cheng, L., Y. Wang, L. Meng, X. Hu, Y. Cui, Y. Sun, L. Zhu, J. Ali, J. Xu, and Z. Li. 2012. Identification of salt-tolerant QTLs with strong genetic background effect using two sets of reciprocal introgression lines in rice. Genome 55:45–55.

Chiou, L. W. 2011. Root Comparative Proteomic Analysis of Initial Salt-Stressed Rice Seedlings TNG67 and Its Salt-Sensitive Mutant SA0604, Salt-Tolerant Mutant SM75. Master Thesis. Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 106 pp. (in Chinese with English abstract)

Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Phil. Trans. R. Soc. B 363:557–572.

Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169–196.

Collard, B. C. Y., C. M. Vera Cruz, K. L. McNally, P. S. Virk, and D. J. Mackill. 2008. Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: Current status and future considerations. Intl. J. Plant Genomics 2008:524–547.

Courtois, B. and R. Lafitte. 2003. Using marker-aided selection for a specific drought-tolerance trait. p.84–90. *in*: Breeding Rice for Drought-Prone Environments. (Fischer, K. S., R. Lafitte, S. Fukai, G. Altin, and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños. 98 pp.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. Crop Sci. 39:1295–1301.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 2000. PLABSIM: Software for simulation of marker-assisted backcrossing. J. Hered. 91:86–87.

Hittalmani, S., A. Parco, T. V. Mew, R. S. Zeigler, and N. Huang. 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. Theor. Appl. Genet. 100:1121–1128.

Hsu, J. H. 2012. The Platform of Polymorphic Markers and Genetic Mapping of a Drought Tolerance Gene at Seedling Stage in Rice. Master Thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)

Hsu, Y. K. 2010. Comparative Proteomic Analysis of Initial Salt-stressed Rice Seedlings TNG 67 and its Salt-sensitive Mutant SA0604, Salt-tolerant Mutant SM75. Master Thesis. Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 128 pp. (in Chinese with English abstract)

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Jwo, W. S. 2007. Physiological Characterizations of Salt Tolerance at Germaination and Seedling Stages in Rice (*Oryza sativa* L.) Tainung 67 Mutants. Master Thesis. Master Programs of Life Sciences, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 122 pp. (in Chinese with English abstract)

Jwo, W. S., C. G. Chern, M. H. Lai, H. M. Yen, T. H. Tseng, and H. E. Yen. 2008. Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. J. Taiwan Agric. Res. 57:193–204. (in Chinese with English abstract)

Kazuhiro, K., Y. Niwa, T. Yamaguchi, H. Sunohara, H. Hirano, and M. Umeda. 1998. A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. Plant Biotechnol. 15:45–48.

Khush, G. S. and D. S. Brar. 2002. Biotechnology for rice breeding: progress and impact. p.41–58. *in*: Proceedings of the 20th Session of the International Rice Commission: Sustainable Rice Production for Food Security. July, 23–26, 2002. Bangkok, Thailand. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Khush, G. S. 2005. What it will take to feed five billion rice consumers in 2030. Plant Mol. Biol. 59:1–6.

Liao, Y. N. 2012. The Genetic Analysis and Coarse Mapping of the Rice Floury Gene, *FLOURY ENDOSPERM6* (*FLO6*). Master Thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract)

Moradi, F., A. M. Ismail, G. B. Gregorio, and J. A. Egdane. 2003. Salinity tolerance of rice during reproductive development and association with tolerance at the seedling stage. Ind. J. Plant Physiol. 8:105–116.

Myint, K. K. M., D. Fujita, M. Matsumura, T. Sonoda, A. Yoshimura, and H. Yasui. 2012. Mapping and pyramiding of two major genes for resistance to the brown planthopper [*Nilaparvata lugens* (Stål)] in the rice cultivar ADR52. Theor. Appl. Genet. 124:495–504.

Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Y. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, and D. J. Mackill. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. Theor. Appl. Genet. 115:767–776.

Redona, E. D. and D. J. Mackil. 1996. Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. Theor. Appl. Genet. 92:395–492.

Sharma, P. N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. Hereditas 140:61–69.

Shen, Y.J., H. Jiang, J. P. Jin, Z. B. Zhang, B. Xi, Y. Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q. B. Yu, H. J. Liu, D. H. Chen, J. H. Gao, H. Huang, T. L. Shi,

and Z. N. Yang. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. Plant Physiol. 135:1198–1205.

Singh, R. K. and B. Mishra. 2004. Role of central soil salinity research institute in genetic improvement of rice varieties in India. p.189–242. *in*: Genetic Improvement of Rice Varieties in India. (Sharma, S. D. and U. P. Rao, eds.) Today & Tomorrows Printers and Publishers. New Delhi. 1251 pp.

Thomson, M. J., M. de Ocampo, J. Egdane, M. A. Rahman, A. G. Sajise, D. L. Adorada, E. Tumimbang-Raiz, E. Blumwald, Z. I. Seraj, R. K. Singh, G. B. Gregorio, and A. M. Ismail. 2010. Characterizing the *saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. Rice 3:148–160.

Wang, G. L., D. J. Mackill, J. M. Bonman, S. R. McCouch, M. C. Champoux, and R. J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421–1434.

Yen, C. C. 2011. Mutagenetic Breeding and Linkage-Marker Analyses of Salt-Tolerant Rice. Doctoral Dissertation. Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 141 pp. (in Chinese with English abstract)

Yano, M. and T. Sasaki. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. Plant Mol. Biol. 35:145–153.

Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in*: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute, Manilla. 83 pp.

Marker-Assisted Selection of Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.)

Su-Chen Kuo[1], Chieh-Wei Kuo[2], Yann-Rong Lin[3], and Yong-Pei Wu[4,*]

Abstract

Kuo, S. C., C. W. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2013. Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). J. Taiwan Agric. Res. 62(2):137–156.

The salt-tolerant mutant line ‘SM61’ was crossed to IR64, an elite *indica* variety which is widely grown in the world, to introgress gene(s) conferring salt tolerance to ‘IR64’ as the recurrent parent by backcrossing. The progenies of each backcross generation were screened salt tolerance by the treatment of 200 mM NaCl and consequently selected by markers for background selection to recover the recurrent parent’s genome. The means of recurrent parent’s genome were 75.0, 89.0 and 96.4% in selected BC_1F_1, BC_2F_1 and BC_3F_1 individuals, respectively. As compared to the mean recovery genome of BC_3F_1 plants by conventional backcrossing was 88.4%, background selection by marker-assisted selection (MAS) was more efficient to breed salt-tolerant lines. ‘SM61’, ‘IR64’ and six BC_3F_4 salt-tolerant lines derived from the backcross of ‘SM61‘/‘IR64’ were evaluated for salt tolerance under the treatment of 200 mM NaCl at three-leaf, five-leaf, seven-leaf, and after maximum tillering stages. Three salt-tolerant lines, ‘ST12’, ‘ST18’ and ‘ST59’, exhibited higher tolerance to salt stress than both the donor parent and the recurrent parent did, implying that the salt-tolerant characteristic of ‘SM61’ was successfully transferred to ‘IR64’ and generated new high salt-tolerant *indica* lines by MAS. In addition, the grain yields of twenty salt-tolerant BC_3F_4 lines were produced more than 5,000 kg per hectare, indicating that these twenty salt-tolerant lines can be grown in fields for cultivation. Hopefully these salt-tolerant lines will be registered as new rice varieties and be available for rice production on saline fields locally and internationally.

Key words: Marker-assisted selection (MAS), Mutant lines, Salt-tolerant Rice.

Received: January 30, 2013; Accepted: April 12, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

04-吳永培.indd 156 2013/7/8 下午 04:09:17